

18/5/3

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010677611

WPI Acc No: 1996-174566/199618

XRAM Acc No: C96-055000

Human serum albumin gene modified by introduction of restriction site - useful for production of fusion proteins by inserting active peptide coding sequence into new restriction site

Patent Assignee: ASAHI GLASS CO LTD (ASAG)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 8051982	A	19960227	JP 94209369	A	19940811	199618 B

Priority Applications (No Type Date): JP 94209369 A 19940811

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 8051982	A	19	C12N-015/09	

Abstract (Basic): JP 8051982 A

A modified gene coding for human serum albumin (HSA), prepared by introducing restriction enzyme cleavage site(s) into at least one arbitrary position of a gene encoding wild-type HSA, is new. Also claimed are: (1) a fusion protein prepared by introducing gene(s) coding for physiologically active peptide(s) into the restriction enzyme cleavage site(s) of the modified gene; and (2) a gene encoding the fusion protein.

USE - Physiologically active fusion proteins can be produced by inserting their coding sequences into the restriction sites newly introduced into the HSA gene.

ADVANTAGE - The use of the modified HSA gene permits any form of physiologically active peptide to be readily introduced by genetic engineering into a specific site in human serum albumin, thus enabling the easy preparation of a novel physiologically active fusion protein.

Dwg.0/8

Title Terms: HUMAN; SERUM; ALBUMIN; GENE; MODIFIED; INTRODUCING; RESTRICT; SITE; USEFUL; PRODUCE; FUSE; PROTEIN; INSERT; ACTIVE; PEPTIDE; CODE; SEQUENCE; NEW; RESTRICT; SITE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C07K-019/00; C12N-001/19; C12P-021/02; C12R-001-645

File Segment: CPI

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-51982

(43)公開日 平成8年(1996)2月27日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/09	ZNA			
C 07 K 19/00		8318-4H		
// C 12 N 1/19		8828-4B		
C 12 P 21/02	C 9282-4B			
	9281-4B	C 12 N 15/00	ZNA A	
		審査請求 未請求 請求項の数13 FD (全19頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願平6-209369

(22)出願日 平成6年(1994)8月11日

(71)出願人 000000044
旭硝子株式会社
東京都千代田区丸の内2丁目1番2号

(72)発明者 東田 英毅
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 村上 喜美子
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 浜 祐子
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

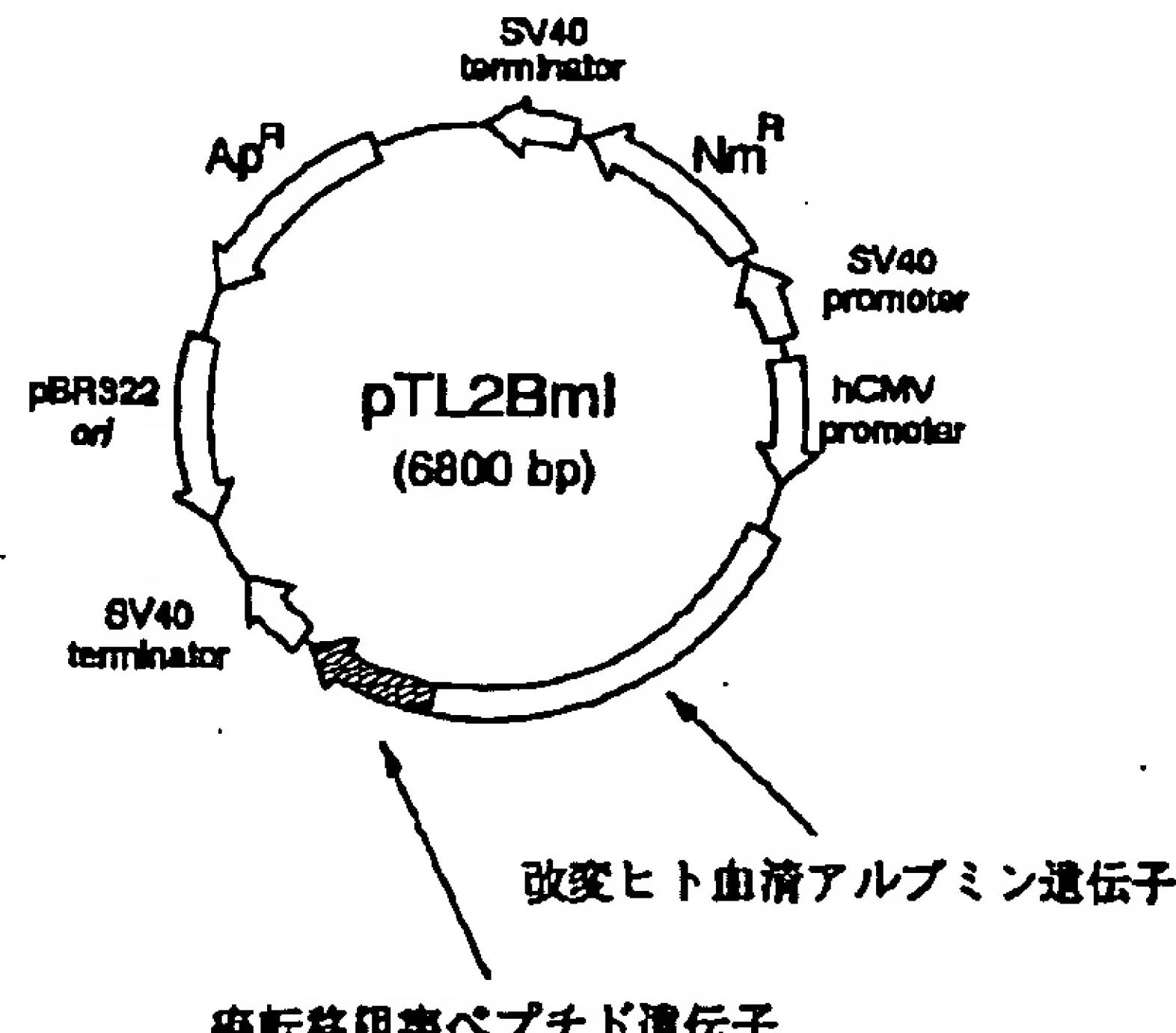
(74)代理人 弁理士 長谷川 洋子 (外2名)
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子

(57)【要約】

【目的】生理活性を有するペプチドと、キャリアとしてのヒト血清アルブミンとを遺伝子工学的に結合して融合タンパク質を製造する際に、該ペプチドとの結合をしやすく改変した、改変ヒト血清アルブミン遺伝子を提供する。

【構成】天然型のヒト血清アルブミンをコードし、少なくとも1つ以上の所望の位置に、特にヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1~2ドメインあるいは第2~3ドメイン間に、制限酵素切断部位を導入してなる、ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子、並びに、該遺伝子を用いて遺伝子組換え手法によって製造された生理活性を有する融合タンパク質。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 天然型のヒト血清アルブミンをコードする遺伝子の少なくとも1つ以上の所望の位置に制限酵素切断部位を導入してなる、ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子。

【請求項2】 制限酵素切断部位の導入位置が、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間のうちのいずれか1箇所若しくはこれらの任意の組み合わせの位置である、請求項1に記載の遺伝子。

【請求項3】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端である、配列番号1の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項4】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第1～2ドメイン間である、配列番号2の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項5】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖の第2～3ドメイン間である、配列番号3の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項6】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のカルボキシル末端である、配列番号4の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項7】 制限酵素切断部位の導入位置がヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、第1～2ドメイン間、第2～3ドメイン間およびカルボキシル末端である、配列番号5の塩基配列で表される、請求項2に記載の遺伝子。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載の遺伝子の制限酵素切断部位に生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子を導入することによって作製した融合タンパク質。

【請求項9】 請求項8に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【請求項10】 生理活性を有するペプチドが配列番号6のアミノ酸で表される、請求項8に記載の融合タンパク質。

【請求項11】 生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子が、配列番号7の塩基配列で表される、請求項9に記載の遺伝子。

【請求項12】 配列番号8のアミノ酸配列で表される、請求項8に記載の融合タンパク質。

【請求項13】 配列番号9の塩基配列で表される、請求項12に記載の融合タンパク質をコードする遺伝子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、遺伝子組換え技術によ

50

2

る新規融合タンパク質を作製する際に最適な、改変ヒト血清アルブミン遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】 生理活性を有するペプチドを医薬品などの目的で使用する際、そのペプチドのみを単独で投与した場合、目的とする生理活性を十分に示さないことがしばしば起こる。これは主に分解酵素による不安定化や臟器への吸着が原因である。この問題を解決するために、通常、生理活性ペプチドと生体高分子との融合体を作製し、その融合体を投与する方法が取られている。用いることのできる生体高分子の例は数多くあるが、体内、特に血中に多量に存在するため副作用が最も少ないと予想される、血清アルブミンを用いることが好適に用いられる。

【0003】 生理活性ペプチドと血清アルブミンの融合体を作製するには、化学的に結合する方法が常法とされている。例えば、癌転移阻害活性を有することが確認されているペプチドであるIIF-2(特開平3-34993号公報、Isoai et al., Jpn. J. Cancer Res., 81, 909-914 (1992) および Isoai et al., Cancer Res., 52, 1422-1426 (1992))を用いる場合、該ペプチドと血清アルブミンを水溶性カルボジイミドで結合させて新規融合タンパク質を作製し、使用することによって、単独の該ペプチドと比較してより強い癌細胞浸潤阻害活性並びに癌転移抑制活性を示すことが本願発明者らにより確認されている(特開平4-254000号、同4-300899号、同4-300900号公報およびBiochem.

Biophys. Res. Commun., 192, 7-14 (1993))。すなわち、該ペプチドを単独で用いる場合に比べ、1/50～1/60の低濃度で、ヒトおよびマウス由来高転移性癌細胞の細胞外基底膜への浸潤を強く抑制した。さらに、癌細胞をマウスの尾静脈より注入し肺や肝臓などの主要臓器に転移させるいわゆる「実験的転移モデル」系において、該ペプチドと血清アルブミンよりなる新規融合タンパク質は、該ペプチド単独で用いる場合に比べ、1/10以下の低用量で同等以上の転移阻害活性を示した。

【0004】 上記の癌転移阻害ペプチドと血清アルブミンの融合体の場合のように、融合タンパク質を構成する生理活性ペプチドと生体高分子の両者が、どちらもタンパク質性アミノ酸の直鎖状結合によって構成される場合、遺伝子工学的に目的融合タンパク質が作製可能であることは、容易に推測できる。すなわち目的とする融合タンパク質をコードする遺伝子を作製し、大腸菌や酵母を宿主とする異種タンパク質生産システムに導入して作製すればよい。遺伝子工学的に作製することによって、化学的に結合する方法では作製することのできない融合タンパク質の作製が可能である。例えば、生体高分子の特定の位置に生理活性ペプチドを導入することや、融合タンパク質中の生理活性ペプチドと生体高分子の個数の比を制御することが容易になる。

【0005】したがって、遺伝子操作技術を用いて生理活性ペプチドを結合させる際に、キャリアとして用いる生体高分子を、いかに目的の生理活性ペプチドを組込みやすいものを選択するか、あるいはいかに組込みやすく改変するかが問題であった。それと同時に、どのようなタイプの生理活性ペプチドでも結合できるような構造を持っていることが必要である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はかかる事情に鑑みてなされたもので、融合タンパク質を作製するキャリアとして最適な血清アルブミン遺伝子を提供するものである。そして、これを用いて遺伝子組換え技術により効率的かつ大量に融合タンパク質を生産せしめることが可能となる。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ね、生理活性ペプチドを容易に組込むことができるヒト血清アルブミン遺伝子を考案設計し、遺伝子組換え技術を用いて作製するとともに、実際に生理活性ペプチドと結合させた新規融合タンパク質を作製することによって、この融合タンパク質が目的とする生理活性を示すことを確認した。

【0008】すなわち本発明によれば、天然型のヒト血清アルブミンをコードする遺伝子の少なくとも1つ以上の所望の位置に制限酵素切断部位を導入してなる、ヒト血清アルブミンをコードする改変された遺伝子が提供される。

【0009】ここで、前記制限酵素切断部位の導入位置が、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖のアミノ末端、カルボキシル末端、第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間のうちのいずれか1箇所若しくはこれらの任意の組み合わせの位置であるのが好ましい。

【0010】また本発明によれば、上記いずれかの遺伝子の制限酵素切断部位に生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子を導入することによって作製した融合タンパク質が提供される。

【0011】さらに本発明によれば、上記融合タンパク質をコードする遺伝子が提供される。

【0012】以下、本発明について詳述する。

【0013】本発明の改変ヒト血清アルブミン遺伝子は、生理活性を有するペプチドとの結合を容易ならしめるために、天然型のヒト血清アルブミンをコードする遺伝子に新たに制限酵素切断部位を導入して作製される。

【0014】改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製のために用いる天然のヒト血清アルブミン遺伝子は、例えば、ヒト肝臓cDNAライブラリーよりプラスミドpILMALB5(国立予防衛生研究所遺伝子バンク)の制限酵素PvuII-HindIII断片をプローブとしてクローニングすること等により得ることができる。なお、ヒト血清アルブミン遺伝子には、そのアミノ酸配列

が互いに若干異なっているという多型が報告されており、上記の方法でクローニングしたヒト血清アルブミン遺伝子もその範囲に入るものである。本発明における「ヒト血清アルブミン」とは、これらすべての多型のものを含み得る。

【0015】次に、このヒト血清アルブミン遺伝子の所定位置に制限酵素切断部位をもつ断片を導入し、改変ヒト血清アルブミン遺伝子を作製する。この制限酵素切断部位の導入は、後に生理活性を有するペプチド遺伝子(例えば、癌転移阻害遺伝子など)の結合を容易ならしめるためのもので、癌転移阻害遺伝子結合の際にはこの部位を制限酵素にて切断し、この切断部に癌転移阻害遺伝子を結合させるためである。

【0016】改変の対象である制限酵素切断部位を導入する位置は、ヒト血清アルブミンのポリペプチド鎖中に任意の位置に設定することが可能であるが、活性を十分に発揮させることを考慮すると、タンパク質の表面に位置しており、かつ立体構造を破壊することのない位置であることが好ましい。例えば、アミノ末端(N末端)あるいはカルボキシル末端(C末端)など、ヒト血清アルブミンの立体構造の形成に影響を及ぼさないと考えられる位置が望ましい。また、ヒト血清アルブミンの立体構造は、X線結晶解析よって詳細に検討されており(Xia o, M. H., and Carter, D. C. Nature, 358:209-215, 1992)、3個あるドメインの間、すなわち第1～2ドメイン間あるいは第2～3ドメイン間も、導入部位の候補となり得る。導入する制限酵素切断部位の個数は、必要に応じて、単一の位置、ないしは複数の位置に、単数あるいは複数個導入し得る。

【0017】導入する制限酵素切断部位は、既知の制限酵素によって認識されるものであればよい。望ましくは、ヒト血清アルブミン中にほとんど存在しない切断部位であり、かつ切断酵素が容易に入手できるものが望ましい。特に6塩基認識でかつ消化後に粘着末端を形成するものがライゲーションを行ううえで好ましい。また、当然に天然のアミノ酸配列を一切変更しないことと同時に、塩基配列もできるだけ変更しないことが望ましい。以上の点を鑑みて、アミノ末端およびカルボキシル末端に制限酵素Afl I I I I 切断部位を、第1～2ドメイン間に制限酵素Hind I I I 切断部位を、第2～3ドメイン間に制限酵素EcoRI 切断部位を導入するのが最も好ましい。なお、制限酵素切断部位導入法としては任意の方法を用い得るが、当業分野で常用されているPCRを用いた変異導入法等が好適に用いられる。

【0018】さらに本発明では、生理活性を有するペプチドをコードする遺伝子を作製し、これを上記改変ヒト血清アルブミン遺伝子の制限酵素切断部位に結合させて、生理活性を有する融合タンパク質遺伝子を作製する。次いで、この遺伝子を発現ベクターに導入し、さらにこのベクターを用いて宿主細胞で該遺伝子を発現さ

せ、宿主細胞内より抽出、精製することによって、生理活性融合タンパク質を製造する。

【0019】この生理活性を有するペプチドとしては、例えば、配列番号6のアミノ酸配列で表される癌転移阻害活性を有するペプチド（癌転移阻害ペプチド；特開平3-34993号公報）等が挙げられる。この癌転移阻害ペプチドをコードする遺伝子としては理論的には幾通りもの数多くの配列が考えられ得るが、望ましくは遺伝子組換えに用いる宿主細胞のコドン使用頻度に合わせたものがよく、最も多頻度で使用されるコドンを用いて設計するのがよい。

【0020】ここで、用いる宿主細胞としては特に限定されるものではないが、望ましくは培養方法が容易で、低コストで培養できる微生物がよく、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、各種酵母類、枯草菌、糸状菌等、当業分野で常用されている宿主細胞等が挙げられる。原核生物を宿主細胞として用いる形質転換方法では必ずしも全てのポリペプチドに対して有効ではなく、真核生物由来のタンパク質の複雑な翻訳後修飾あるいは天然体と同じ立体構造を再現することは必ずしも容易ではない。また特有のエンドトキシンが存在する場合は、最終製品の夾雑物になる可能性があり、好ましくない。このため好ましくは、エンドトキシンを含まず、培養方法も確立しており、従来より醸酵並びに食品工業で用いられており、人体に関する安全性も確立されている各種酵母類がよい。このなかでも特に、遺伝学的並びに分子生物学的に動物細胞に近い性質をもつとされ、より天然体に近い遺伝子産物が得られることが期待される分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) が最も好ましい。このシゾサッカロミセス・ポンベの菌株としては、例えば寄託番号ATCC38399 (leu-32^{b-}) やATCC38436 (ura4-294^{b-}) 等としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に寄託されているものが挙げられ、入手可能である。

【0021】したがって本発明においては、配列番号6で表される癌転移阻害ペプチドをコードする遺伝子は、シゾサッカロミセス・ポンベでの高発現に至適なコドンを用いて設計し、合成したものであるのが最も好ましい。シゾサッカロミセス・ポンベの最適コドン使用頻度は、例えば A. Nasim et al.: *Molecular Biology of the Fission Yeast*, p. 263, Academic Press (1983) 等から知ることができる。本発明者らは種々研究を重ねた結果、配列番号7の塩基配列で表される遺伝子が最も好適であるとの結論を得、設計、合成した（ただし配列番号7の塩基配列は、翻訳開始シグナル (ATG) および翻訳終了シグナル (TAA) を付加している）。なお、遺伝子の作製（合成）は、トリエステル法 (Nuc. Acid. Res. 10, p. 6553, (1982)) やホスホアミダイト法 (Tetrahedron Letters 22, p. 1859, (1981)) などの種々の

方法がすでに開発されており、いずれの方法を用いててもよい。またDNA合成機器 (DNAシンセサイザー) 等が市販されているので、それらを用いててもよい。

【0022】次に、上記のようにして作製した新規の癌転移阻害融合タンパク質遺伝子をベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。用いるベクターは特に限定されるものではないが、宿主細胞内で自律的に複製可能であって、癌転移阻害融合タンパク質合成遺伝子（外来遺伝子）を組み込み得る挿入部位をもち、さらにこの組み込んだ合成遺伝子を宿主細胞内で発現せしめることを可能とする領域を有する必要がある。このようなベクターとして、例えば本発明者らがすでに創出に成功しているシゾサッカロミセス・ポンベを宿主とする外来遺伝子発現ベクターpTL2M（特願平5-249310号明細書）等を有利に用いることができ、これらのベクターに上記合成遺伝子を容易に組み込み得る。

【0023】次いで上記組換えベクターを宿主細胞内に導入し、形質転換体を得る。組換えベクターの宿主細胞内への導入法は、従来慣用的に用いられている方法により行うことができ、コンピテント細胞法、プロトプラスト法、リン酸カルシウム共沈法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポソーム融合法、パーティクル・ガン法等、種々のものが挙げられるが、用いる宿主に応じてそれぞれ任意の方法を取り得る。シゾサッカロミセス・ポンベを宿主とする場合は、例えば酢酸リチウム法 (K. Okazaki et al., Nucleic Acids Res., 18, 6485-6489(1990)) 等によって効率よく形質転換体を得ることができる。

【0024】このようにして得られた形質転換体を培養することにより、培養物中に癌転移阻害融合タンパク質が产生される。これを公知の方法で単離し、場合により精製することにより、目的とする癌転移阻害融合タンパク質が得られる。

【0025】形質転換体を培養するための培地は公知であり、YPD培地などの栄養培地 (M. D. Rose et al., "Methods In Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press(1990)) や、MB培地などの最少培地 (K. Okazaki et al., Nucleic Acids Res., 18, 6485-6489(1990)) 等を用いることができる。形質転換体の培養は、通常16~42°C、好ましくは25~37°Cで、8~168時間、好ましくは24~72時間行う。振盪培養と静置培養のいずれも可能であるが、必要に応じて攪拌や通気を加えてよい。

【0026】培養物中に產生した融合タンパク質の単離・精製法としては、公知の塩析または溶媒沈殿法等の溶解度の差を利用する方法、透析、限外濾過またはゲル電気泳動法等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の

差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。

【0027】単離・精製した融合タンパク質の確認方法としては、公知のウエスタンプロッティング法や活性測定法等が挙げられる。また、精製された融合タンパク質は、アミノ酸分析、アミノ末端分析、一次構造解析などによりその構造を明らかにすることができる。

【0028】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明する。但し、本発明はこれらの実施例によりその技術範囲が限定されるものではない。また実施例中の各操作については、特に記載したもの以外は、当業界で常用されている方法（例えば J.Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989.）に従った。

【0029】【実施例1】配列番号1の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19（宝酒造（株）製）上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを錠型として、配列番号12および13の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR增幅を行ない、次いで制限酵素NcoI（宝酒造（株）製）およびHindIII（宝酒造（株）製）によって末端調節（部分消化）を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1800塩基対に相当するバンドを切り出し、DNA-PREP（旭硝子）を用いたガラスピース法で精製し、挿入断片とした。

【0030】さらにこれとは別に、シゾサッカロミセス・ポンベ発現ベクターpTL2Mを用意した。このベクターpTL2Mは、本願発明者らがすでに構築したものである（特願平5-249310号明細書）。以下にその作製方法を述べる。

【0031】【ベクターpRL2Mの作製】まず、公知の方法で調製されたpCD4CATをBamHIで切断し、CAT遺伝子を除去後ライゲーションし、pCD4を作製した。pCD4をBamHIで部分切断し、平滑末端化した後ライゲーションしてpCD4Bを作製した（特開平5-15380号公報）。

【0032】このプラスミドpCD4Bを制限酵素SacIで消化後、末端をT4DNAポリメラーゼで平滑化し、さらに制限酵素BamHIで消化した後、フェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製した。さらにアガロースゲル電気泳動後、ガラスピース法によって約4500塩基対に相当するDNAを精製した。

【0033】一方、これとは別に、ヒト線維芽細胞由来の岡山-バーグcDNAライブラリー（pCDベクター）を公知の方法により調製した。さらに、既に知られているヒトリポコルチンIの遺伝子配列（Nature, 320,

77, (1986)）のうち、タンパク質のN末端側アミノ酸配列をコードする50塩基の遺伝子配列をDNAプローブとして上述のライブラリーからリポコルチンIの遺伝子をコロニーハイブリダイゼーション法により取得し、塩基配列を決定することにより、リポコルチンIタンパク質全長をコードするものであることを確認した。取得したクローンをpCD11poiと名づけた。（特開平5-15380号公報）。そしてこのヒトリポコルチンI遺伝子（cDNA）を含むベクターpCD11poiを

10 制限酵素XmnIおよびBamHIで消化した後、フェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製した。さらにアガロースゲル電気泳動後、ガラスピース法によって約1300塩基対に相当するDNAを精製した。

【0034】両DNAをライゲーションした後、これを大腸菌DH5株（東洋紡（株）製）に導入して形質転換した。得られた形質転換体よりベクターを調製し、目的とするベクターpRL2L（図5）を持った形質転換体をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0035】このリポコルチンI発現ベクターpRL2Lを制限酵素EcoRIおよびHindIIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約5000塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスピース法で精製した。これとは別に、公知のプラスミドpUC19を制限酵素EcoRIおよびHindIIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により約60塩基対に相当するバンドを切り出し、ゲルから30 抽出精製した。

【0036】これら両者の断片をライゲーションの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpRL2M（図6）をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0037】【ベクターpTL2Mの作製】上記pRL2Mを錠型とし、オリゴデオキシリボヌクレオチド5'-TTGACTAGTTATTAAATAGTA-3' およびオリゴデオキシリボヌクレオチド5'-CTAGAATTCACATGTTGAAAAAGTGTCTTATC-40 3'を合成プライマーとして、Taqポリメラーゼを用いたPCRによって目的断片を増幅した。制限酵素SpeIおよびEcoRIで末端調節し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約600塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスピース法で精製した。

【0038】一方、これとは別に、pRL2Mを制限酵素SpeIおよびEcoRIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約4500塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスピース法で精製した。これら両者の断片をライゲーシ

ヨンの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpTL2M(図7)をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0039】このようにして作製したpTL2Mを制限酵素A_f1I1IおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0040】そして上記挿入断片とこの発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計2本を、DNAライゲーションキット(宝酒造(株)製)を用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株(東洋紡(株)製)に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmaを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmaを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号1の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0041】【実施例2】配列番号2の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを錠型として、配列番号12および14の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR增幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびHindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約550塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片1とした。

【0042】一方、これとは別に、同じcDNAを錠型として、配列番号15および13の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR增幅を行ない、制限酵素HindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1350塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片2とした。

【0043】さらにこれとは別に、実施例1の場合と同様にして作製したシソサッカロミセス・ポンベ発現ベクターpTL2Mを用意し、このベクターpTL2Mを制限酵素A_f1I1IおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0044】そして上記挿入断片2本とこの発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計3本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmbを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmbを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号2の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0045】【実施例3】配列番号3の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを錠型として、配列番号12および16の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびEcoRI(宝酒造(株)製)によって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1100塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片1とした。

【0046】一方、これとは別に、同じcDNAを錠型として、配列番号17および13の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素EcoRIおよびHindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約700塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片2とした。

【0047】さらにこれとは別に、実施例1の場合と同様にして作製したシソサッカロミセス・ポンベ発現ベクターpTL2Mを用意し、このベクターpTL2Mを制限酵素A_f1I1IおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0048】そして上記挿入断片2本とこの発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計3本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミドpTL2Bmcを得た。アルカリ-SDS法に従ってpTL2Bmcを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号3の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0049】【実施例4】配列番号4の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりpUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを錠型として、配列番号12および18の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびA_f1I1Iによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈殿による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約1800塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片とした。

【0050】一方、これとは別に、実施例1の場合と同様にして作製したシソサッカロミセス・ポンベ発現ベクターpTL2Mを用意し、このベクターpTL2Mを制限酵素A_f1I1IおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0051】そして上記挿入断片とこの発現ベクターpTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計2本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した

11

後、目的のプラスミド pTL2Bmdを得た。アルカリ-SDS法に従って pTL2Bmdを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号4の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0052】 [実施例5] 配列番号5の改変ヒト血清アルブミン遺伝子の作製

ヒト肝臓cDNAライブラリーより pUC19上にクローニングしたヒト血清アルブミンcDNAを錠型として、配列番号12および14の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素NcoIおよびHindIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約550塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片1とした。

【0053】 これとは別に、同じcDNAを錠型として、配列番号15および16の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素HindIIIおよびEcoRIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約700塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片2とした。

【0054】 またこれとは別に、同じcDNAを錠型として、配列番号17および18の塩基配列で表されるプライマーを用いてPCR増幅を行ない、次いで制限酵素EcoRIおよびAflIIIによって末端調節を行なった。フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約700塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製し、挿入断片3とした。

【0055】 さらにこれとは別に、実施例1の場合と同様にして作製したシソサッカロミセス・ポンベ発現ベクター pTL2Mを用意し、このベクター pTL2Mを制限酵素AflIIIおよびHindIIIで二重消化し、約5000塩基対に相当するバンドを切出した。

【0056】 そして上記挿入断片とこの pTL2Mの上記制限酵素による二重消化物との計4本を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌DH5株に導入して形質転換した後、目的のプラスミド pTL2Bmeを得た。アルカリ-SDS法に従って pTL2Bmeを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号5の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0057】 [実施例6] 癌転移阻害ペプチドをコードする配列番号7の塩基配列で表される遺伝子の作製
配列番号6のアミノ酸配列をもとに、シソサッカロミセス・ポンベのコドン使用頻度 (Nasim, A. et al: Molecular Biology of the Fission Yeast, Academic Press, 1989, p263.) に合せて、配列番号10および11の塩

12

基配列で表される2本の一本鎖オリゴDNAを、DNA自動合成装置 (Applied Biosystems) を用いて合成した。なお、配列番号10の塩基配列は、5'末端に制限酵素BamHIへの挿入部位と開始コドンATGを、3'末端に終始コドンTAAと制限酵素HindIIIへの挿入部位を導入した遺伝子のセンス鎖であり、配列番号11の塩基配列はそのアンチセンス鎖である。脱保護、精製後、これら2本を70℃でアニーリングした。

【0058】 一方、これとは別にプラスミド pUC19を、制限酵素BamHI (宝酒造(株) 製) およびHindIIIで二重消化し、フェノール抽出、エタノール沈澱による精製の後、アガロースゲル電気泳動し、約2600塩基対に相当するバンドを切出し、DNA-PREPを用いたガラスピーズ法で精製した。

【0059】 これら両者の断片を、DNAライゲーションキットを用いてライゲーションした。これを大腸菌JM109株 (宝酒造(株) 製) に導入して形質転換した後、アンピシリン耐性を持ち、かつ X-gal プレート上で白コロニーを提示するポジティブクローンをスクリーニングし、目的のプラスミドすなわち制限酵素BamHI およびHindIII二重消化時に約70塩基対の切断断片を示す pI2Aを得た。アルカリ-SDS法に従って pI2Aを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、目的の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0060】 [実施例7] 癌転移阻害ペプチド遺伝子を含有する発現ベクター pTL2BmIの作製
プラスミド pI2Aを制限酵素NcoIおよびHindIIIの二重消化で末端を調節し、アクリルアミドゲル電気泳動により約70塩基対に相当するバンドを切出し、ゲルから溶出して癌転移阻害ペプチド遺伝子挿入断片とした。

【0061】 この遺伝子断片と実施例4で作製した pTL2Bmdの制限酵素AflIII消化物 (部分消化後、約7000塩基対に相当するバンドをDNA-PREPを用いて精製)との計2本を、DNAライゲーションキットを用いて、ライゲーションした。大腸菌DH5株を形質転換した後、第1図に示す、目的のプラスミド pTL2BmIを得た。アルカリ-SDS法に従って pTL2BmIを大量調製し、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、配列番号7の配列を持ったプラスミドであることを確認した。

【0062】 [実施例8] 発現ベクター pTL2BmIを用いたシソサッカロミセス・ポンベの形質転換
シソサッカロミセス・ポンベのロイシン要求性株、h-leu1-32 (ATCC38399) をロイシン含有最少培地MB-leuで10³細胞数/mlになるまで生育させた。遠心集菌、水による洗菌後10³細胞数/mlになるように100mM酢酸リチウム (pH 5.0) に懸濁し、30℃で60分間インキュベートした。

その後、上記懸濁液 $100\mu l$ に、制限酵素PstIで消化したpAL7 (K. Okazaki et al.: Nucl. Acids Res. 18, 6485-6489 (1990)) $1\mu g$ および $2\mu g$ の発現ベクターpTL2BmIを $10\mu l$ のTEバッファーに溶かした溶液を加え、50%PEG4000を $290\mu l$ 加えてよく混合した後、30℃で60分間、43℃で15分間、室温で10分間の順にインキュベートした。遠心分離によりPEG4000を除去し、1mlの培養液 $1/2$ YEL-Leuに懸濁した。

【0063】この懸濁液から $100\mu l$ を分取し、さらに $900\mu l$ の培養液 $1/2$ YEL-Leuで希釈して、32℃30分間インキュベートした後、 $300\mu l$ を最少寒天培地MMAにスプレッドした。32℃で3日間インキュベートし、得られた形質転換体をG418を $25\mu g/ml$ 含むYEA培地に移し、さらに32℃で5日間培養し、得られたクローンを目的とする各形質転換体とした。

【0064】一方、これとは別に、癌転移阻害ペプチド遺伝子を持たないプラスミドpTL2M(既述)およびpTL2Bm(特願平5-249310号明細書)についても、同じ方法で形質転換体を作製し、ネガティブコントロールとした。なお、プラスミドpTL2Bmは以下のようにして作製した。

【0065】[プラスミドpTL2Bmの作製] 国立予防衛生研究所遺伝子バンクより供与を受けた、ヒト血清アルブミンcDNAを含むベクターpILMALB5を鋳型とし、オリゴデオキシリボヌクレオチド5'-AGACCA TGGATGCACACACAAGAGTGAGGT-3'およびオリゴデオキシリボヌクレオチド5'-CAGGAAACAGCTATGACCAT-3'を合成プライマーとして、Taqポリメラーゼを用いたPCRによって目的断片を増幅した。制限酵素NcoIおよびHindIIIで末端調節し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約1800塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスピーズ法で精製した。

【0066】これとは別に、pTL2Mを制限酵素AluIおよびHindIIIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿の後、アガロースゲル電気泳動により約5000塩基対に相当するバンドを切り出し、ガラスピーズ法で精製した。

【0067】これら両者の断片をライゲーションの後、大腸菌DH5株を形質転換して目的とするベクターpTL2Bm(図8)をスクリーニングした。部分塩基配列の確認および制限酵素地図の作製から目的のベクターであることを確認した。

【0068】[実施例9] 形質転換体の培養および無細胞抽出液の調製

抗生素質G418 (GIBCO BRL) を $200\mu g/ml$ の濃度で含む $50ml$ のYPD培地 [(2%グルコース(和光純薬(株)製)、1%バクトイーストエキス(DI

eco)、2%バクトペプトン(Difco)]に、実施例8で作製した形質転換体を植菌し、32℃で5日間培養した。その培養液から 10^8 個の菌体を集菌し、洗菌後、50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で懸濁し、超音波破碎を行った。終濃度が1%になるように10%SDS溶液を加え、80℃で15分間加熱した。遠心分離によって無細胞抽出液(上清)を得た。

【0069】これとは別に、癌転移阻害ペプチド遺伝子を持たない上記pTL2MおよびpTL2Bmを導入した形質転換体についても、同様の方法で無細胞抽出液を作製し、ネガティブコントロールとした。

【0070】[実施例10] SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による癌転移阻害融合タンパク質の発現解析

SDS-PAGEによって、実施例9で作製した各形質転換体由来の無細胞抽出液について発現解析を行なった。結果を図2に示す。同図から明らかなように、pTL2mBIによる形質転換体では、コントロールであるpTL2Bmによる形質転換体に比較して、分子量69,000のバンド(同図中、*で示す)が、癌転移阻害融合タンパク質を産生していることによって、分子量71,000の位置(同図中、**で示す)に移動していることが検出できた。デンシトメータによって測定したところ、癌転移阻害融合タンパク質の産生量は、全菌体タンパク質の30%程度であった。

【0071】[実施例11] ウエスタンプロットティングによる癌転移阻害融合タンパク質の確認

実施例9で作製した各形質転換体由来の無細胞抽出液について実施例10と同様にしてSDS-PAGEを行なった。得られたゲルをPVDF膜(Bio-Rad)に転写し、癌転移阻害ペプチドに特異的な抗体(A. Isoai et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 192, 7-14 (1993))を用いてウエスタンプロットティングを行い、ECL(アマシャム(株)製)によって検出した。結果を図3に示す。同図から明らかなように、該融合タンパク質を含む配列に相当する分子量71,000附近の位置に唯一の明瞭なバンドが得られることから、該融合タンパク質に特異的なアミノ酸配列が含まれている融合タンパク質が産生していることが確認された。

【0072】[実施例12] 癌転移阻害融合タンパク質の精製

pTL2BmIにより形質転換された形質転換体を、G418を $25\mu g/ml$ の濃度で含む $50ml$ のYPD培地で32℃、1日間前培養した後、G418を $200\mu g/ml$ 含む1リットルのYPD培地に $1 \times 10^8 / ml$ の割合で植菌してさらに4日間培養した。集菌後の菌体の4倍量の50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5) [$12\mu M$ のAPMSF(和光純薬(株)製)、 $2.5\mu M$ ロイペプチド(和光純薬(株)製)、 $2mM$ のEDTAを含む]に懸濁し等量のガラスピーズ(ビードビ

15

ーター)を用いて0℃で破碎した。12,000 rpmで20分間遠心分離した沈殿を同じ緩衝液で洗浄した後、6Mグアニジン塩酸と10mMのジチオスレートールを含んだ50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)にて50℃1時間で可溶化した後、12,000 rpm、20分間遠心分離した上清を0.1MNacI、1mM EDTA、2mM還元型グルタチオン、0.2mM酸化型グルタチオンを含んだ50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で100倍(v/v)に4℃で徐々に希釈した。1晩4℃で放置後、限外濾過膜(アミコン)にて濃縮しスーパーロース12カラムにてゲル濾過し、各画分についてSDS-PAGEにて解析し分子量71,000の位置に唯一のバンドが見られた画分を集め精製癌転移阻害融合タンパク質とした。

【0073】【実施例13】精製癌転移阻害融合タンパク質の癌細胞浸潤阻害活性の測定

実施例12で精製した癌転移阻害融合タンパク質について、癌細胞の浸潤抑制効果を調べた。評価方法は Albini らの方法(Albini et al.: Cancer Res. 47, 3239-3245 (1987))に従って行った。8μmのポアサイズを持つポリカーボネートフィルターにより、上層と下層に分けられたケモタキセル(クラボウ(株)製)のフィルター上面に10μgのマトリゲル(コラボレーティブ(株)製)を塗布し、室温で一晩乾燥させた。使用直前に培養液で膨潤させ、24穴のカルチャープレートにセットした。癌細胞はB16メラノーマ由来の高転移性クローンB16FE7を使用した。

【0074】細胞を1.85kBq/m1の[¹²⁵I]IUDR(アマシャム(株)製)存在下で2日間培養した。使用直前にトリプシン溶液で細胞を回収した後、0.1%の牛血清アルブミンを含む培養液に懸濁し細胞数と、取り込まれた[¹²⁵I]IUDRの放射能を計測

配列

CC ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	50
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	98
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTC AAA TTA GTG AAT GAA GTC ACT	146
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTC GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC	194
AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT	242
CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	290
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	338
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	386
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	434
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA	482
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	530
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	578
TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	626
GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT	674
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC	722
AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT	770
GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC	818

16

した。ケモタキセルの下層には20μg/m1のヒトフィブロネクチンを入れ、上層には5×10⁴個の細胞を種々の濃度の癌転移阻害融合タンパク質と共に入れ、炭酸ガスインキュベータ中で20時間培養した。

【0075】培養終了後、フィルターの上面に残っている細胞を綿棒でかきとり、フィルターをティッシュソルビライザー(アマシャム(株)製)で下面に移動した細胞と富みに溶解した後、放射能を計測した。結果を図4に示す。同図から明らかなように、本癌転移阻害融合タンパク質により、癌細胞の浸潤が有意に阻害されたことが示された。

【0076】

【発明の効果】以上詳述したように、本発明による改変ヒト血清アルブミン遺伝子を用いることによって、どのような形の生理活性ペプチドであっても、ヒト血清アルブミンの特定の位置に、遺伝子工学的に容易に組むことが可能になった。したがって、本発明を用いて新規な生理活性融合タンパク質を容易に作製することが可能になったといえる。

20 【0077】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1763

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

30 存在位置：3.. 1763

特徴を決定した方法：E

17

18

TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	866
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	914
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	962
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1010
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG	1058
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT	1106
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG	1154
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1202
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1250
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1298
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1346
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1394
CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1442
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1490
ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1538
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1586
GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA	1634
CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC	1682
AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1730
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA	1763

配列番号：2

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：1761

配列の特徴

配列の型：核酸

特徴を表す記号：CDS

鎖の数：二本鎖

存在位置：1.. 1761

トポロジー：直鎖状

特徴を決定した方法：E

配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	48
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	96
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT	144
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC	192
AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT	240
CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	288
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	336
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	384
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	432
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA	480
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	528
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTT GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	576
TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	624
GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT	672
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC	720
AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT	768
GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC	816
TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	864
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	912
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	960
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1008
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG	1056
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT	1104
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG	1152

19

20

CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1200
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1248
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1296
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1344
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1392
CAT GAG AAA ACG CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1440
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1488
ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1536
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1584
GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA	1632
CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTC GAG AAG TGC TGC	1680
AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1728
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA	1761

配列番号：3

配列の種類：c DNA t o mRNA

配列の長さ：1761

配列の特徴

配列の型：核酸

特徴を表す記号：CDS

鎖の数：二本鎖

存在位置：1.. 1761

トポロジー：直鎖状

特徴を決定した方法：E

配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	48
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	96
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTC AAA TTA GTG AAT GAA GTC ACT	144
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTC GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC	192
AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT	240
CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	288
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	336
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	384
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	432
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA	480
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	528
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	576
TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	624
GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT	672
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC	720
AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT	768
GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC	816
TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	864
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	912
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	960
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1008
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG	1056
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT	1104
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTC AAA CCT CTT GTG GAA GAG	1152
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1200
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1248
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1296
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1344
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1392
CAT GAG AAA ACG CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1440
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1488

21

22

ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1536
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1584
GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA	1632
CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC	1680
AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1728
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA	1761

配列番号：4

配列の長さ：1765

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

*配列の種類：c DNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

10 存在位置：1..1758

* 特徴を決定した方法：E

配列

ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	48
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	96
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT	144
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC	192
AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT	240
CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	288
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	336
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	384
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	432
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA	480
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	528
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	576
TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	624
GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT	672
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC	720
AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT	768
GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC	816
TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	864
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	912
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	960
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1008
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG	1056
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT	1104
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG	1152
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1200
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1248
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1296
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1344
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1392
CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1440
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1488
ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1536
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1584
GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA	1632
CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC	1680
AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1728
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAC ATG T	1765

配列番号：5

50 配列の長さ：1767

23

配列の型：核酸
 鎮の数：二本鎮
 トボロジー：直鎮状
 配列の種類：cDNA to mRNA

24

*配列の特徴
 特徴を表す記号：CDS
 存在位置：3..1760
 * 特徴を決定した方法：E

配列

CC ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA	50
GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG TTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT	98
CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT	146
GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC	194
AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT	242
CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA	290
CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	338
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	386
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	434
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA	482
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	530
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTT GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	578
AGC TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	626
GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT	674
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC	722
AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT	770
GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC	818
TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	866
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	914
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	962
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1010
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG	1058
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT	1106
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTC AAA CCT CTT GTG GAA GAG	1154
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1202
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1250
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1298
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1346
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1394
CAT GAG AAA ACG CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1442
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1490
ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1538
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1586
GCA CTT GTT GAG CTC GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA	1634
CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC	1682
AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1730
GTT GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAC ATG T	1767

配列番号：6

トボロジー：直鎮状

配列の長さ：21

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

Ala Glu Asp Gly Asp Ala Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys Ala Glu Gly

1 5 10 15

Ala Gly Asp Ala Lys

20 21

25

26

配列番号：7

配列の長さ：71

配列の型：核酸

* 鎮の数：二本鎮

トポロジー：直鎮状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CC ATG GCC GAG GAC GGT GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT GAG 50
 GGT GCC GGT GAC GCC AAG TAA 71

配列番号：8

配列の長さ：609

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎮状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu
 20 25 30
 Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr
 35 40 45
 Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp
 50 55 60
 Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr
 65 70 75 80
 Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu
 85 90 95
 Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn
 100 105 110
 Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe
 115 120 125
 His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala
 130 135 140
 Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
 145 150 155 160
 Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala
 165 170 175
 Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala
 180 185 190
 Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly
 195 200 205
 Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe
 210 215 220
 Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr
 225 230 235 240
 Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp
 245 250 255
 Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile
 260 265 270
 Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser
 275 280 285
 His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro
 290 295 300
 Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr
 305 310 315 320

27

28

Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala
 325 330 335
 Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys
 340 345 350
 Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His
 355 360 365
 Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu
 370 375 380
 Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys Gln Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val
 405 410 415
 Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly
 420 425 430
 Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro
 435 440 445
 Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu
 450 455 460
 His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu
 465 470 475 480
 Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu
 485 490 495
 Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala
 500 505 510
 Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr
 515 520 525
 Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln
 530 535 540
 Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys
 545 550 555 560
 Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu
 565 570 575
 Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Tyr Met Ala Glu Asp Gly
 580 585 590
 Asp Ala Lys Thr Asp Gln Ala Glu Lys Ala Glu Gly Ala Gly Asp Ala
 595 600 605
 Lys
 609

配列番号：9

配列の長さ：1832

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

40 配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：3..1832

特徴を決定した方法：E

配列

CC ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GCT CAT CGG TTT AAA GAT TTG GGA 50
 GAA GAA AAT TTC AAA GCC TTG GTG ATT GCC TTT GCT CAG TAT CTT 98
 CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT CAT GTA AAA TTA GTG AAT GAA GTA ACT 146
 GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTA GCT GAT GAG TCA GCT GAA AAT TGT GAC 194
 AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC ACA GTT GCA ACT 242
 CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA 290

29

30

CCT GAG AGA AAT GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAC CCA AAC	338
CTC CCC CGA TTG GTG AGA CCA GAG GTT GAT GTG ATG TGC ACT GCT TTT	386
CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA TAT GAA ATT GCC	434
AGA AGA CAT CCT TAC TTT TAT GCC CCG GAA CTC CTT TTC TTT GCT AAA	482
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCT	530
GCC TGC CTG TTG CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT	578
TCG TCT GCC AAA CAG AGA CTC AAA TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA	626
GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTG GCT CGC CTG AGC CAG AGA TTT	674
CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC	722
AAA GTC CAC ACG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT	770
GAC AGG GCG GAC CTT GCC AAG TAT ATC TGT GAA AAT CAG GAT TCG ATC	818
TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT GAA AAA CCT CTG TTG GAA AAA TCC	866
CAC TGC ATT GCC GAA GTG GAA AAT GAT GAG ATG CCT GCT GAC TTG CCT	914
TCA TTA GCT GCT GAT TTT GTT GAA AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT	962
GCT GAG GCA AAG GAT GTC TTC CTG GGC ATG TTT TTG TAT GAA TAT GCA	1010
AGA AGG CAT CCT GAT TAC TCT GTC GTG CTG CTG AGA CTT GCC AAG	1058
ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT	1106
GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CTT GTG GAA GAG	1154
CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAC TGT GAG CTT TTT AAG CAG CTT GGA	1202
GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTA	1250
CCC CAA GTG TCA ACT CCA ACT CTT GTC GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA	1298
AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC	1346
TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTG GTC CTG AAC CAG TTA TGT GTG TTG	1394
CAT GAG AAA ACG CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACA AAA TGC TGC ACA GAG	1442
TCC TTG GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA	1490
ACA TAC GTT CCC AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA	1538
GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT	1586
GCA CTT GTT GAG CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA ACA AAA GAG CAA	1634
CTG AAA GCT GTT ATG GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTC GAG AAG TGC TGC	1682
AAG GCT GAC GAT AAG GAG ACC TGC TTT GCC GAG GAG GGT AAA AAA CTT	1730
GTG GCT GCA AGT CAA GCT GCC TTA GCC TTA TAC ATG CCC GAG GAC GGT	1778
GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT GAG GGT GCC GGT GAC GCC	1826
AAG TAA	1832

配列番号：10

* 鎖の数：一本鎖

配列の長さ：73

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCC ATG GCC GAG GAC GGT GAC GCC AAG ACC GAC CAA GCT GAG AAG GCT	50
GAG GGT GCC GGT GAC GCC AAG TA	73

配列番号：11

40※トポロジー：直鎖状

配列の長さ：73

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の型：核酸

アンチセンス：Yes

※

配列

AGCTTA CTT GGC GTC ACC GGC ACC CTC AGC CTT CTC AGC TTG GTC GGT CTT	51
GGC GTC ACC GTC CTC GGC CAT G	73

配列番号：12

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：28

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

31

AGACCATGGA TGCACACAAG AGTGAGGT

配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

AATAAGCTTT TGATCTTCAT

配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

AGCAAGCTTT GGCAACAGGC

配列番号：15

配列の長さ：29

配列の型：核酸

配列

AGCAAGCTTG ATGAACTTCG GGATGAAGG

配列番号：16

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

AGCGAATTCA TCGAACACTT TGGC

配列番号：17

配列の長さ：29

配列の型：核酸

配列

AGCGAATTCA AACCTCTTGT GGAAGAGGCC

配列番号：18

配列の長さ：40

配列の型：核酸

配列

AAGAAGCTTG AATTACACATG TATAAGCCCTA AGGCAGCTTG

32

28

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AATAAGCTTT TGATCTTCAT

20

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCAAGCTTT GGCAACAGGC

20

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCAAGCTTG ATGAACTTCG GGATGAAGG

29

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCGAATTCA TCGAACACTT TGGC

24

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCGAATTCA AACCTCTTGT GGAAGAGGCC

29

*鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AAGAAGCTTG AATTACACATG TATAAGCCCTA AGGCAGCTTG

40

る。

【図面の簡単な説明】

【図1】発現ベクターpTL2BmIの構成図である。

【図2】SDS-PAGE観察図である。

【図3】ウエスタンプロット観察図である。

【図4】癌細胞浸潤阻害活性測定結果を示すグラフである

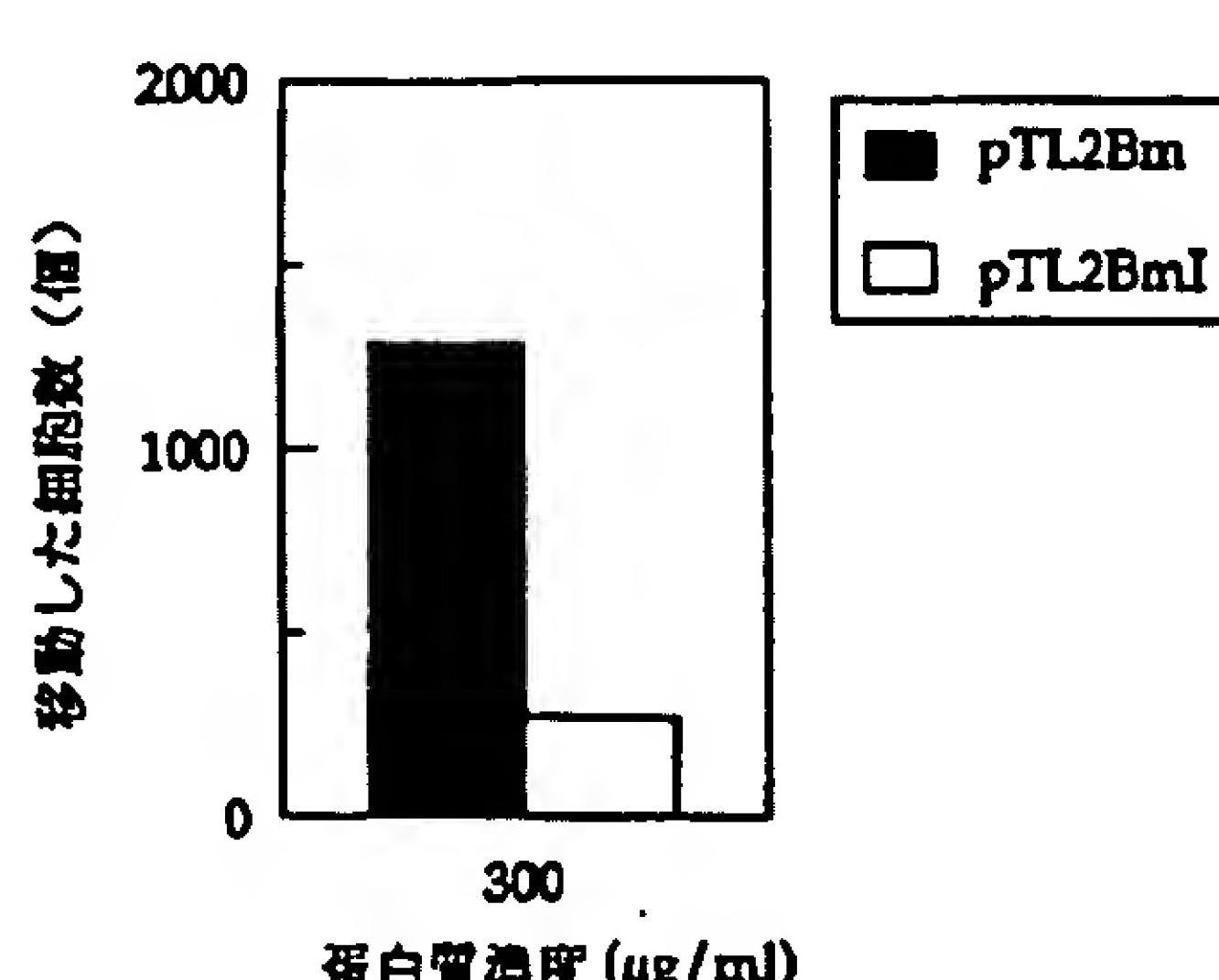
【図5】発現ベクターpRL2Lの構成図である。

【図6】発現ベクターpRL2Mの構成図である。

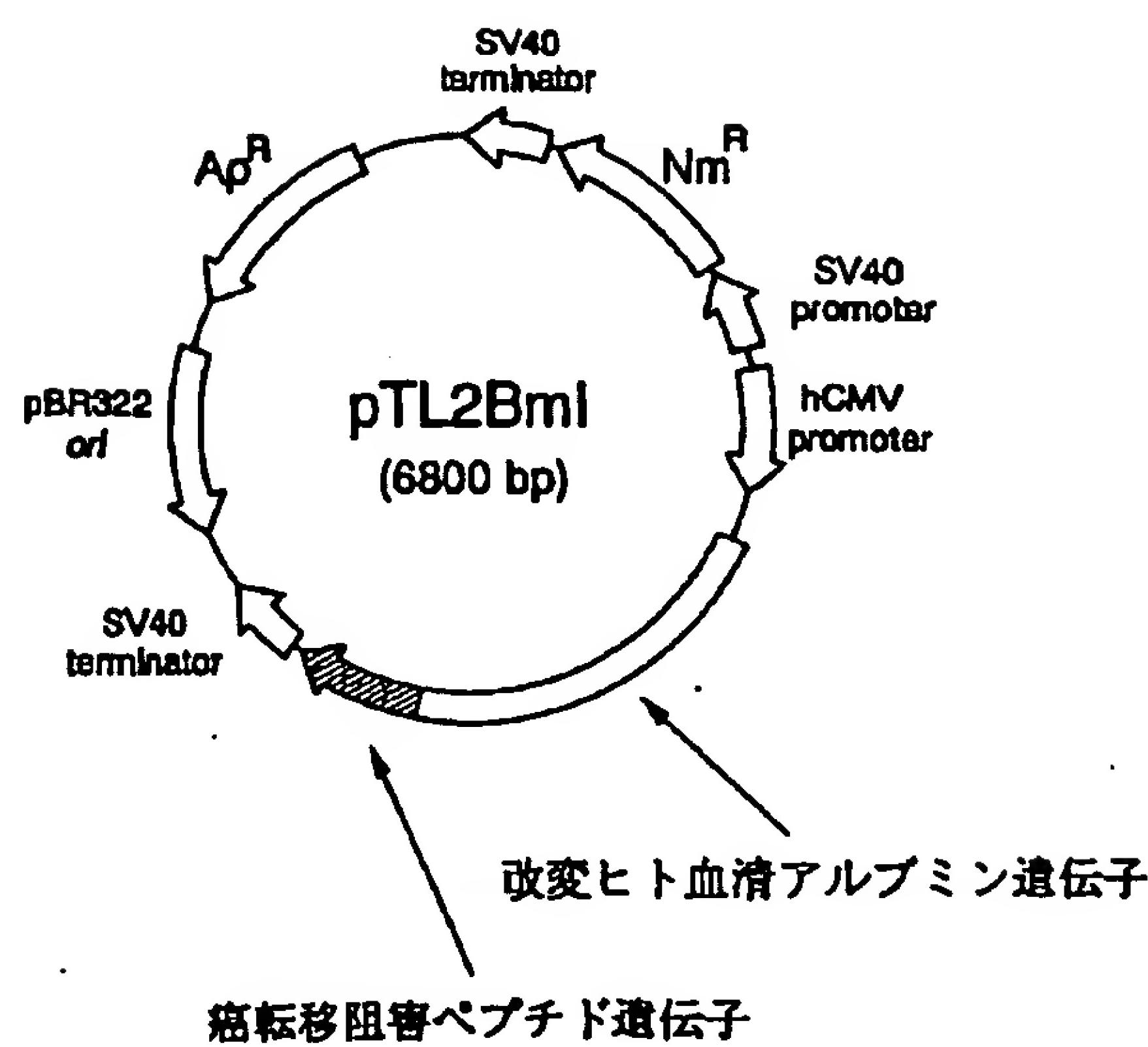
【図7】発現ベクターpTL2Mの構成図である。

【図8】発現ベクターpTL2Bmの構成図である。

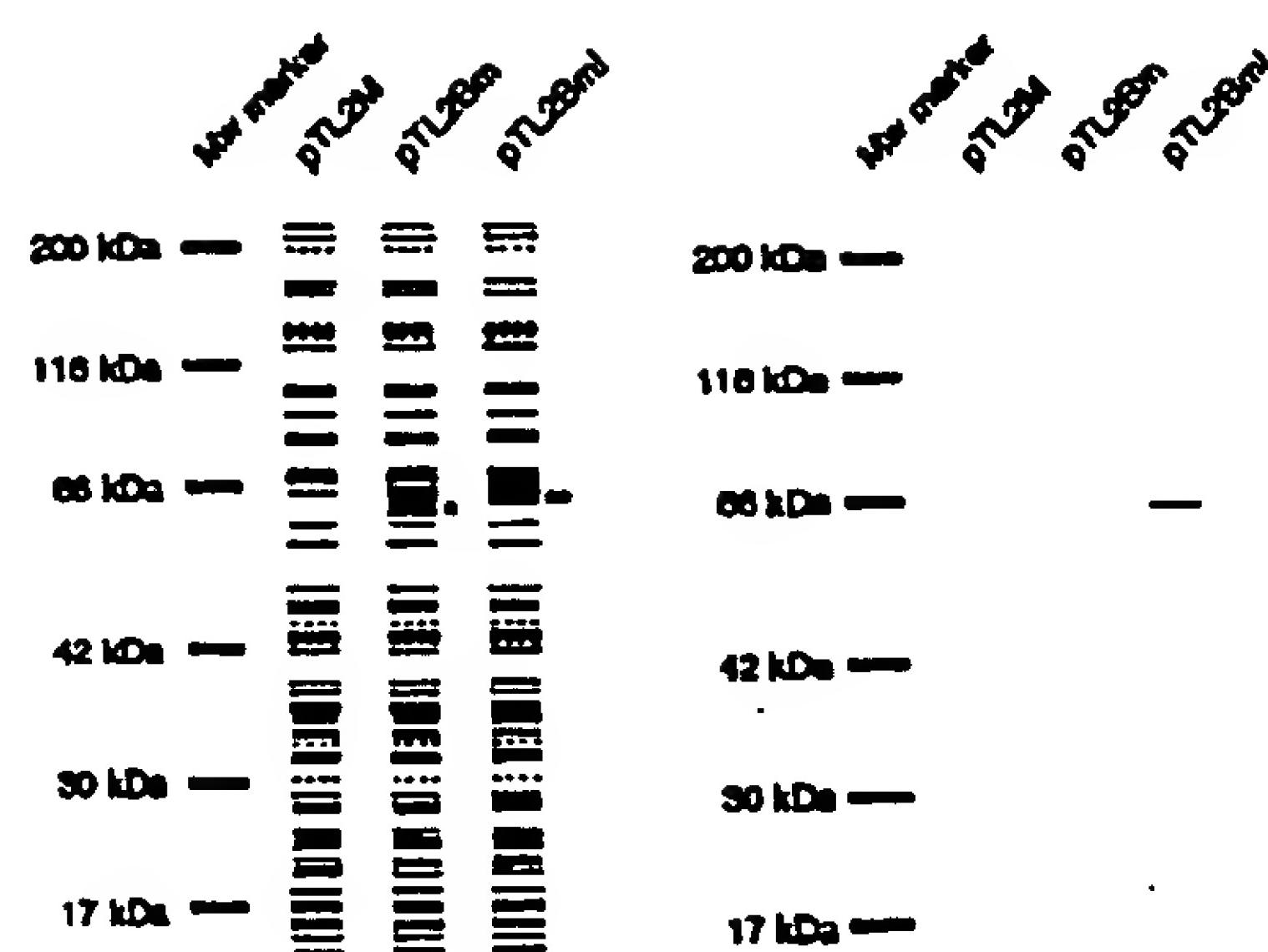
【図4】



【図1】

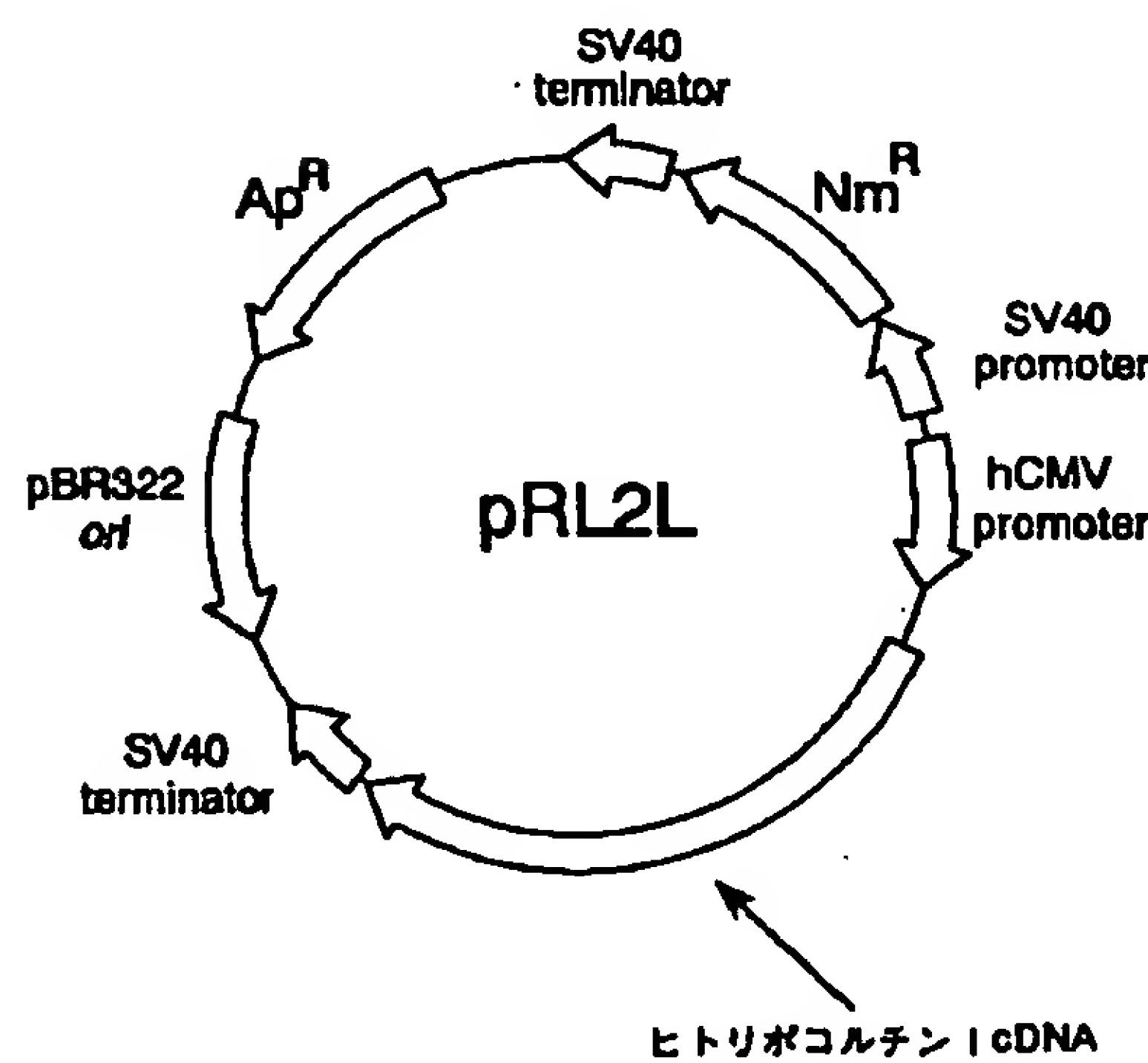


【図2】

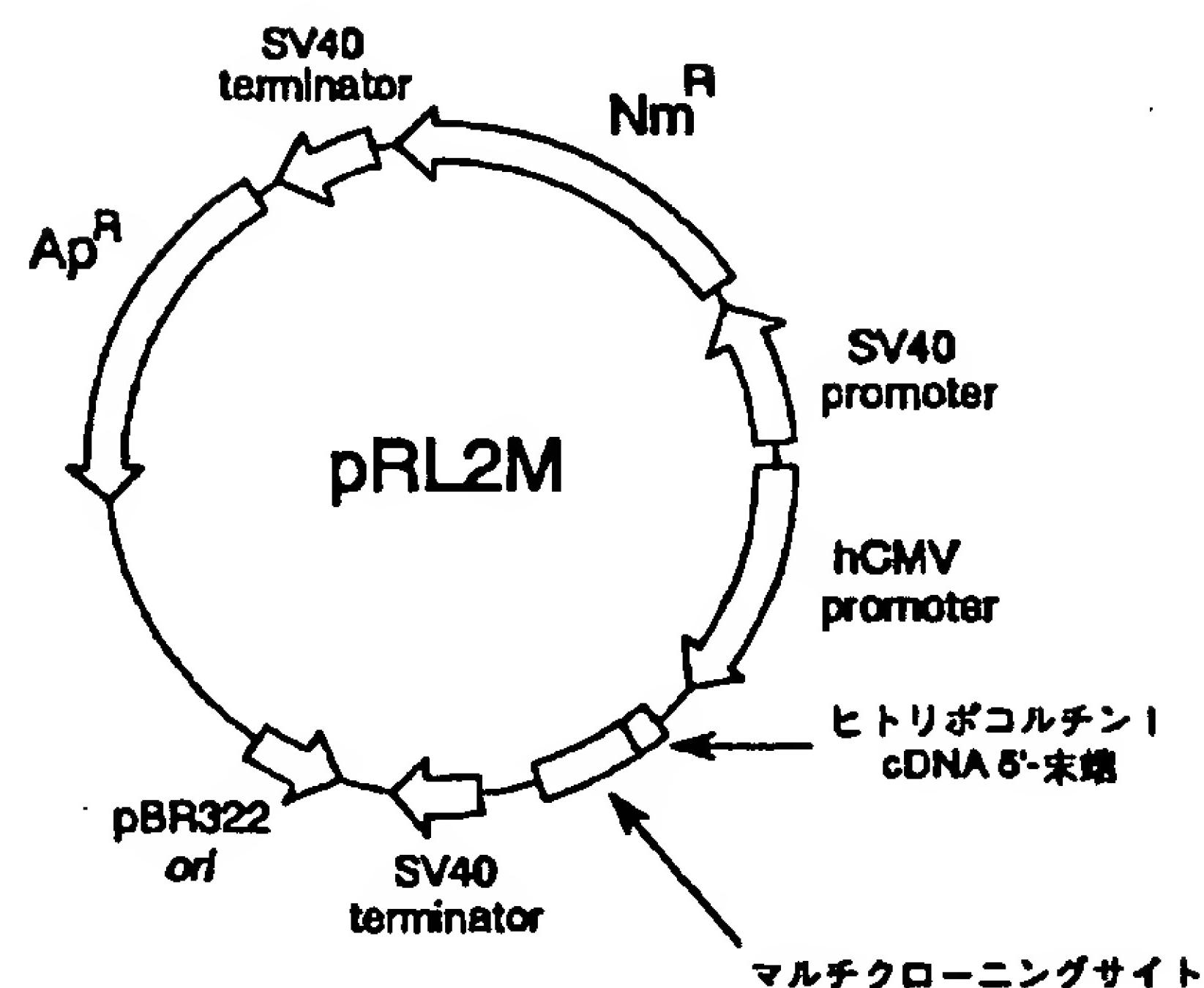


【図3】

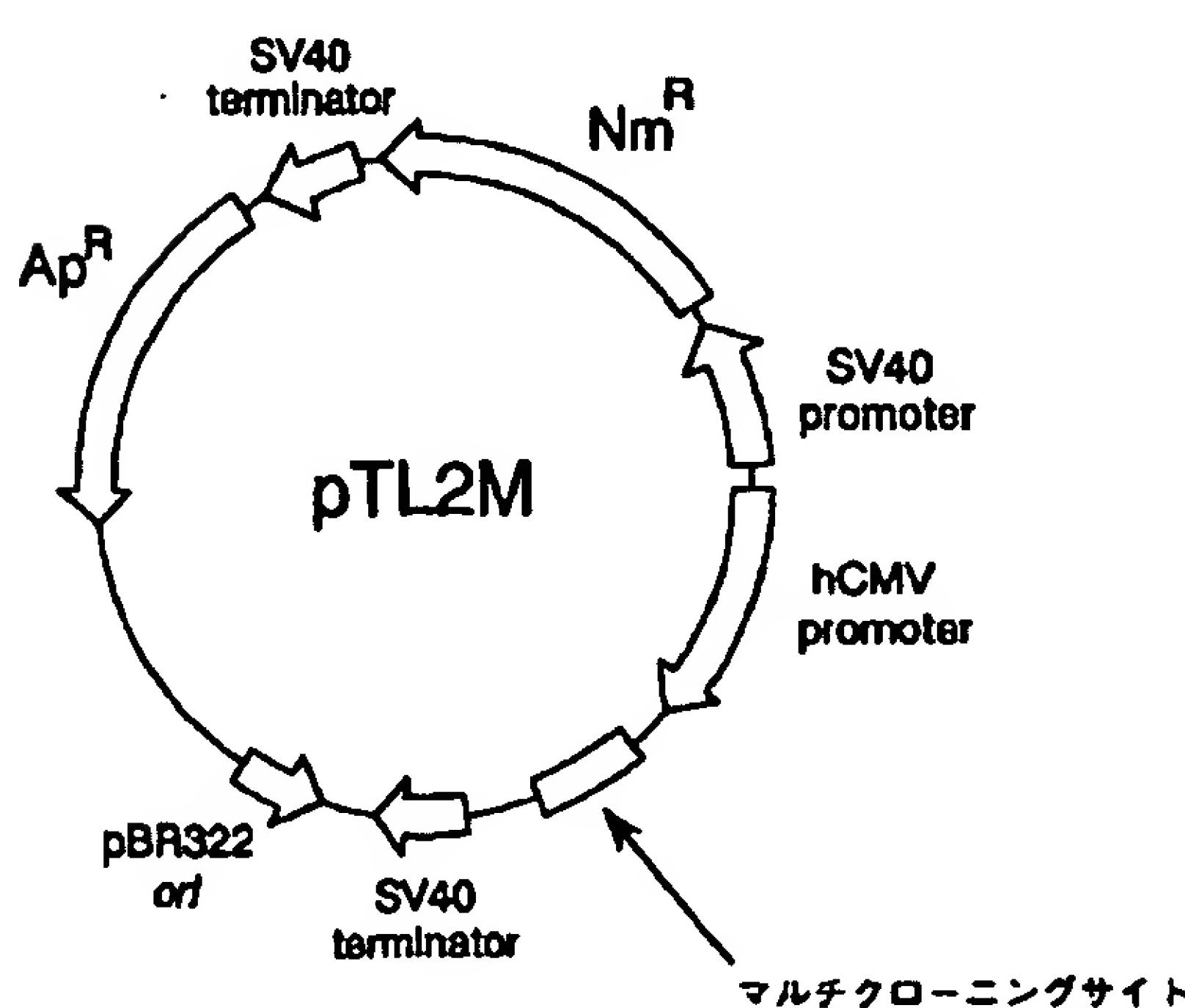
【図5】



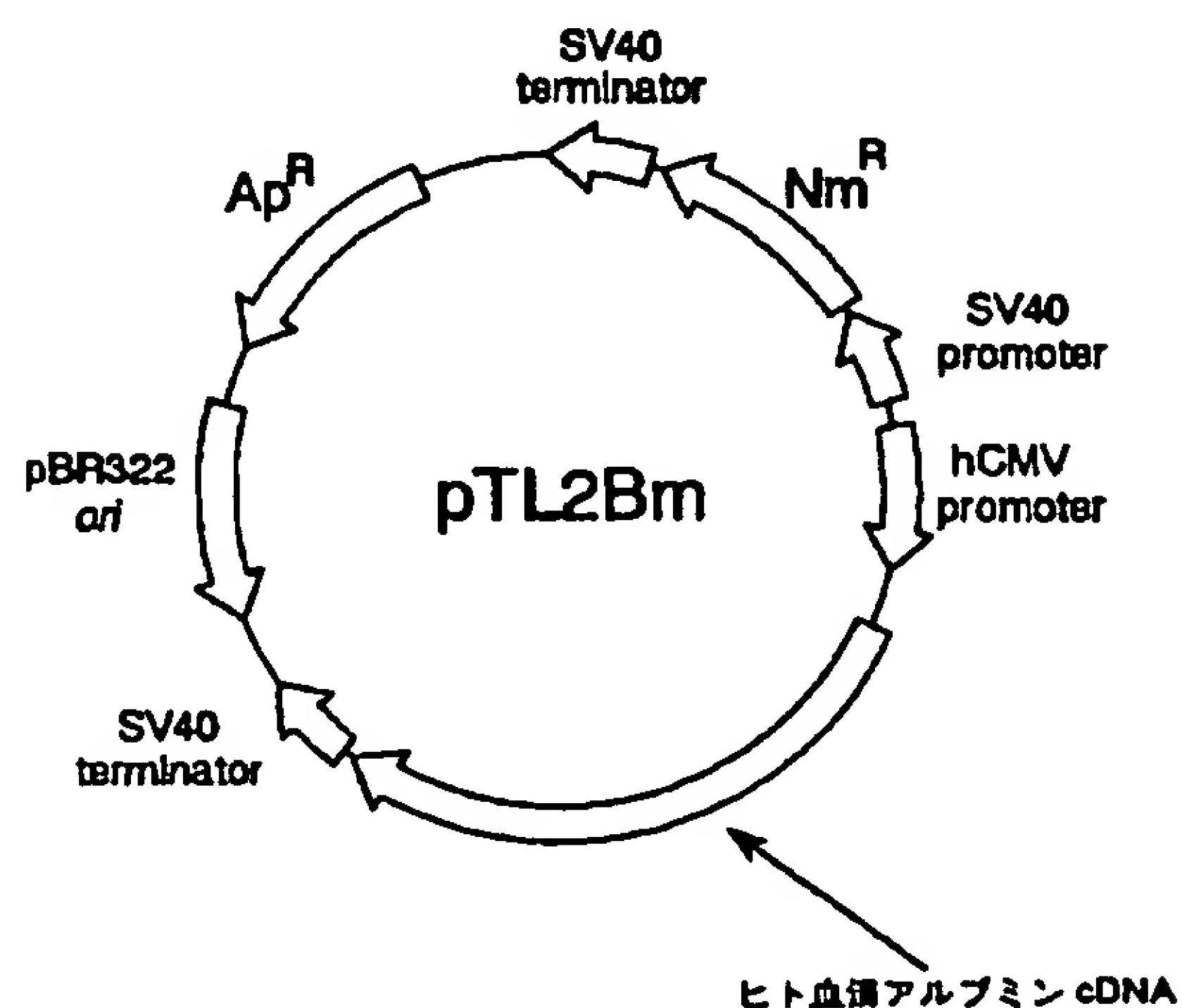
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁶ 認別記号 厅内整理番号 F I 技術表示箇所
(C 1 2 N 1/19
C 1 2 R 1:645)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:645)

(72)発明者 塚本 洋子
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

(72)発明者 磯合 敦
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内
(72)発明者 熊谷 博道
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地
旭硝子株式会社中央研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.